

بررسی فراوانی شیوع ژن های ویروالانس Fim H و PAI در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت های ادراری در شهر رشت

سیده زینب قاسمی پور^۱، علی صالح زاده^{۱*}، حجت‌اله زمانی^۲

(۱) گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
(۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۳

چکیده

مقدمه: اشریشیاکلی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده عفونت مجاری ادراری است. سویه های این باکتری انواع مختلفی از فاکتورهای ویروالانس از جمله چسبنده ها، توکسین ها و سیستم های جذب آهن را دارا می باشند. ژن های ویروالانس بر روی عناصر ژنتیکی متحرک و یا در نواحی خاصی از کروموزوم که جزایر بیماری زایی نامیده می شوند، قرار دارند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های ویروالانس Fim H و PAI در باکتری های اشریشیاکلی جدا شده از عفونت های ادراری در شهر رشت بوده است.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۵۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به چند آزمایشگاه تشخیص طبی شهر رشت انجام شد. باکتری اشریشیاکلی با استفاده از تکنیک های بیوشیمیایی و میکروب شناسی استاندارد شناسایی شد و فراوانی ژن های ویروالانس Fim H و PAI با استفاده از آزمایش PCR بررسی گردید.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که ۷۶ درصد از زنان و ۲۴ درصد از مردان مبتلا به عفونت مجاری ادراری بودند ($P < 0.01$) که نشان دهنده شایع تر بودن عفونت ادراری در زنان نسبت به مردان می باشد. بر اساس نتایج آزمایش PCR میزان فراوانی ژن Fim H، ۴۲ مورد (۸۴ درصد) و ژن PAI، ۳۸ مورد (۷۶ درصد) بود و در ۳۳ مورد هر دو ژن Fim H و PAI (۶۶ درصد) شناسایی شدند.

بحث و نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که شیوع ژن های ویروالانس Fim H و PAI در میان سویه های اشریشیاکلی عامل عفونت ادراری بالا می باشد. بنا بر این، ژن های فوق می توانند به عنوان هدف در مداخلات درمانی مورد بررسی بیشتری قرار گیرند.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، PAI، Fim H، عفونت مجاری ادراری

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

Email: salehzadehmb@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

باکتری اشریشیاکلی یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می باشد. خانواده انتروباکتریاسه، گروه بزرگ و ناهمگون از باسیل های گرم منفی هستند که جایگاه طبیعی آن ها دستگاه گوارش انسان و حیوانات می باشد. اشریشیاکلی، که در روده بزرگ انسان و حیوانات وجود دارد، پاتوژن فرصت طلبی است که خصوصاً در بچه ها ایجاد بیماری می کند. اشریشیاکلی در روده انسان مانع تکثیر و ازدیاد بعضی از باکتری های پروتوتلیک دیگر می شود و از طرف دیگر در ساختن تعدادی از ویتامین های لازم برای بدن از جمله ویتامین K نقش دارد (۱).

عفونت مجرای ادراری نوعی پاسخ التهابی این مجرا نسبت به تهاجم عوامل عفونی از جمله باکتری ها می باشد. میکروارگانیزم های مختلف قادر هستند از راه مجرای ادراری وارد مثانه شده و با طی مسیری به سمت کلیه ها حرکت کنند. چنان چه قسمت های تحتانی مجرای ادراری مانند پیش آب راه و مثانه درگیر شوند، عفونت را التهاب مثانه گویند و بیمار از سوزش و درد در هنگام خروج ادرار رنج می برد. اگر قسمت های فوقانی مجرای ادراری درگیر شود، عفونت را التهاب کلیه می نامند و بیمار از علائمی چون درد پهلو، تهوع، استفراغ، تب و لرز شدید رنج می برد. دستگاه ادراری انسان یکی از شایع ترین محل های عفونت ادراری است (۲). با توجه به شیوع بالا و عوارض جدی، تشخیص و درمان هر چه سریع تر عفونت ادراری ضروری است. اشریشیاکلی به عنوان عامل اصلی و شایع عفونت ادراری در کلیه سنین کاملاً مشخص است (۳). این باکتری می تواند انواع متفاوتی از فیمریه های لازم برای تشخیص و اتصال به گیرنده های مجاری ادراری را تولید کند که فراوان ترین آن ها عبارتند از فیمریه نوع ۱ که توسط ژن fim رمز می شود و فیمریه P که توسط ژن pap رمز می شود. این عوامل اتصال، حمل کننده لیگاندها یا آدهسین ها هستند و به گیرنده های موجود در سطح سلول ها متصل می شوند و مقدمات عفونت های ادراری را ایجاد می کنند (۴). فیمریه نوع ۱، ساختاری پیچیده دارد و به طور عمده شامل یک زیر واحد بزرگ

Fim A و یک نوک فیمریوم است. در فیمریه نوع ۱، ساختار فیبریلی کوچکی قرار دارد که حاوی Fim G، Fim H و احتمالاً ترکیب جزئی از Fim F است و به ساختار میله ای حاوی زیر واحدهای Fim A متصل شده است. در این میان، فیمریه Fim H به بخش های مختلف دستگاه ادراری می چسبد. فیمریه نوع ۱ به مانوز حساس است که البته تهاجم های Fim H به سلول های اپی تلیال توسط باند سیستمین در دومین مانوز و فعال سازی آبشار سیگنال ترانس داکشن با استفاده از پروتئین تیروزین کیناز، فسفوانیزیتید ۳- کیناز و بازآرایی اکتین اسکلت سلولی انجام می شود. عوامل اتصال Fim H گلیکوپروتئین مانوزیل و گیرنده های اینترگرین $\beta 1$ و $\alpha 3$ را از روی سطح لومنی سلول های اپی تلیال مثانه شناسایی می کنند (۵۶).

در واقع فیمریه ها با کمک به باکتری ها در اتصال به سطوح اپی تلیال باعث می شوند تا باکتری در غشاهای مخاطی کلونیزه شوند. زمانی که کلونیزاسیون رخ می دهد، باکتری می تواند بیماری زایی ایجاد نماید (۷). ژن های PAI در واقع زیر گروهی از جزایر ژنومی است که ترکیب و سازماندهی مشابهی با این جزایر دارد. بر اساس مدلی که پترسون و همکاران ارائه دادند، سلول باکتری در ابتدا به صورت انتقال افقی ژن، بلوک هایی از ژن های بیگانه را دریافت کرده که به نام جزایر ژنومی خوانده می شود. اگر این جزایر باعث ایجاد بیماری در موجود شوند، یعنی به عنوان یک انگل عمل کنند «جزایر بیماری زایی» گفته می شود (۸). ژن های PAI اعمالی را که می تواند برای بقا و انتقال میکروب مفید باشد را رمز می کنند. برای مثال PAI رمز کننده جذب سوکروز در سالمونلا سفتنبرگ برای سازگاری متابولیکی این باکتری در میزبان می باشد. ژن های PAI حاوی ژن هایی هستند که فاکتورهای مقاومت آنتی بیوتیکی را رمز می کنند و ژن های مخفی و سیاری مانند ترانسپوزون ها و اینترگرین ها را حمل می کنند که در دسته ای از باکتری ها، پروتئین هایی را رمز می کند که در حذف PAI دخالت دارند. هم چنین آن ها مسئول سنتز پروتئین ها و عوامل اتصال هستند که در سیستم های ترشحی مختلف انجام می شود (۹).

شدت عفونت مجاری ادراری به دو عامل ویروالانس باکتری و حساسیت میزبان بستگی دارد (۱۰). اتصال باکتری به سلول های اپی تلیال مجاری ادراری یک مرحله ضروری برای شروع و گسترش عفونت مجاری ادراری است. این فرآیند به باکتری اجازه می دهد تا در مقابل عملکرد شستشوی ادرار و تخلیه مثانه و فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در میزبان مقاومت کند. سویه های UPEC قادر هستند تا انواع متفاوتی از چسبنده های لازم برای تشخیص و اتصال به رستپورهای مجاری ادراری را تولید کنند (۱۱). علاوه بر این، شرایط میزبان مانند سن بالا و زمینه هایی مانند انسداد مجاری ادراری، دیابت شیرین و ضعف مثانه به کلونیزاسیون باکتری کمک کرده و نقش مهمی در عفونت مجاری ادراری است (۱۲). درمان نامناسب عفونت مجاری ادراری با گذشت زمان می تواند باعث نارسایی کلیه شود (۱۳). فاکتورهای ویروالانس مختلفی به بیماری زایی UPEC نسبت داده می شود (۱۴). آگاهی بهتر از خصوصیات ویروالانس ارگانیسم پاتوژن به پزشک این امکان را می دهد که روند پیشرفت عفونت در میزبان و درمان مناسب آن را پیش بینی کند (۱۳).

با توجه به شیوع عفونت ادراری در جامعه، ضرورت انجام غربالگری، تشخیص و درمان به موقع بیماران از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. به این دلیل که با سهل انگاری در درمان این عفونت، مشکلات جبران ناپذیری در آینده برای بیمار و خانواده او رخ خواهد داد. بنا بر این تحقیق حاضر با هدف بررسی میزان شیوع ژن های ویروالانس Fim H و PAI، که جزء عوامل اولیه برای اتصال باکتری در دستگاه ادراری و ایجاد عفونت دستگاه ادراری می باشند، صورت پذیرفته است.

مواد و روش ها

این مطالعه بر روی ۵۰ سویه اشریشیاکلی جدا شده از ۷۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به چند آزمایشگاه تشخیص طبی در شهر رشت انجام شد. محدوده سنی بیماران از کودک ۷ روزه تا خانم ۷۷ ساله متغیر بود. در این بررسی، سویه های اشریشیاکلی جدا شده با روش های استاندارد میکروب شناسی و آزمایش های بیوشیمیایی مورد

شناسایی قرار گرفتند. نمونه های ادرار بر روی محیط های کشت استاندارد آزمایشگاهی EMB agar و Blood agar و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. کلنی هایی که در این محیط رنگ سبز با جلای فلزی داشتند به عنوان باکتری مورد نظر در نظر گرفته شدند. تست های تشخیصی شامل رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، تست کاتالاز و تست های بیوشیمیایی شامل کشت در محیط های TSI agar، SIM agar، Simmons citrate agar، MR-VP broth و Urea Agar جهت تشخیص و تایید اشریشیاکلی استفاده گردید. پس از شناسایی، باکتری های جدا شده تا زمان انجام آزمایش های بعدی در محیط کشت TSB حاوی ۱۵ درصد گلیسرول و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

باکتری های جدا سازی شده به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط LB کشت داده شدند و DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. نمونه های DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده اند.

از آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) برای شناسایی حضور ژن های ویروالانس استفاده شد. توالی و مشخصات پرایمرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در واکنش PCR ۲/۵ میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از Master mix، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای forward و reverse با یکدیگر مخلوط شدند و حجم نهایی با آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به صورت زیر برنامه ریزی شد. واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه مربوط به ژن Fim H و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه مربوط به ژن PAI و طویل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه سانتی گراد

صحت تکثیر ژن های ویروالانس Fim H و PAI محصول PCR جهت انجام توالی یابی ارسال گردید و توالی های به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژنی NCBI مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد.

به مدت یک دقیقه و در نهایت مرحله طولیل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه انجام شد. محصول به دست آمده از PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و باندهای حاصله تحت پرتو UV آشکارسازی و عکسبرداری گردید. جهت تایید نهایی و

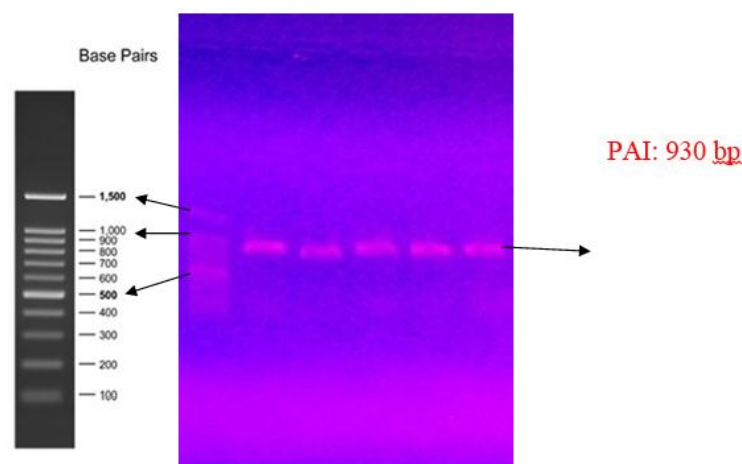
جدول شماره ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن PAI و Fim H

منبع	طول قطعه	توالی پرایمر	نام ژن
<i>Fim H_R^F</i>	518bp	F: 5'TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG 3'	
		R: 5'GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA3'	
<i>PAI_R^F</i>	930bp	F: 5'GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A 3'	
		R: 5'TCG CCA CCA ATC ACA GCC GAA C 3'	

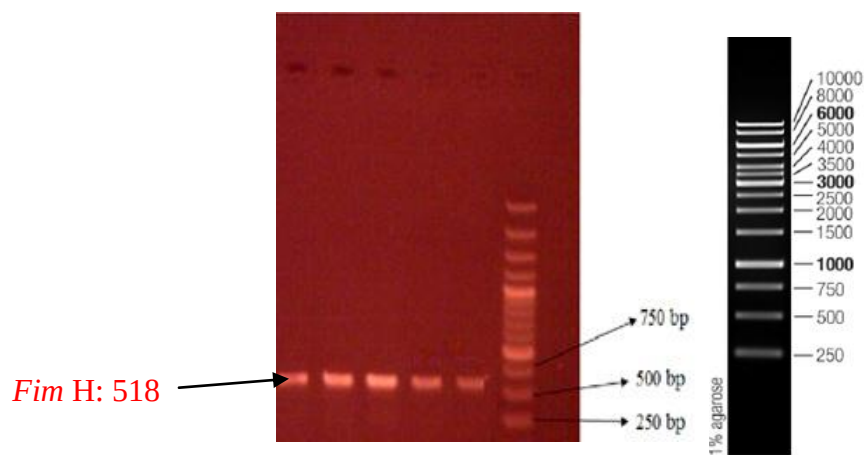
نتایج آزمایش PCR، میزان شیوع ژن Fim H، ۴۲ مورد (۸۴ درصد) و ژن PAI، ۳۸ مورد (۷۶ درصد) بود. هم چنین ۳۳ نمونه حاوی هر دو ژن Fim H و PAI (۶۶ درصد) بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که در بین سویه های مورد بررسی، شیوع ژن Fim H بیشترین درصد آماری را به خود اختصاص داده است. شکل شماره ۱ و ۲ به ترتیب تصاویر الکتروفورز محصول PCR ژن های ویروالانس PAI و Fim H را روی ژل آگارز ۱ درصد نشان می دهد.

یافته های پژوهش

در این مطالعه، از ۷۰ نمونه ادرار افراد مبتلا به آلودگی ادراری استفاده گردید. پس از انجام بررسی های میکروب شناسی و بیوشیمیایی، ۵۰ سویه اشیریشیاکلی جدا گردید. به عبارتی شیوع باکتری اشیریشیاکلی در نمونه ادرار افراد در مطالعه ما ۷۱/۴۳ درصد بود. هم چنین در این مطالعه، مشاهده شد که تعداد کشت مثبت در خانم ها، ۳۸ مورد (۷۶ درصد) و در آقایان ۱۲ مورد (۲۴ درصد) می باشد که این اختلاف از نظر آماری معنی دار می باشد ($P < 0.01$). بر اساس



شکل شماره ۱. نتیجه الکتروفورز ژن PAI در ایزوله های اشیریشیاکلی مورد مطالعه



شکل شماره ۲. نتیجه الکتروفورز ژن Fim H در ایزوله های اشریشیاکلی مورد مطالعه

درصد بود. بنا بر این ژن های Fim H و PAI مورد بررسی در تحقیق حاضر مشابه ژن های Fim H و PAI موجود در بانک ژن به ترتیب با شماره دسترسی های ID:gbIFJ865748.1I و ID:gbICP000247.1I می باشند.

نتایج توالی یابی ژن های ویروالانس Fim H و PAI نشان داد که ژن های تکثیر شده در پژوهش حاضر به درستی تکثیر شده اند (شکل شماره ۳ و ۴). میزان همولوژی ژن های Fim H و PAI با ژن های Fim H و PAI موجود در بانک ژن به ترتیب ۹۵ و ۹۵

Sequence ID: gb|CP000247.1| Length: 4938920 Number of Matches: 1
Range 1: 2976543 to 2977396

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1325 bits(717)	0.0()	811/856(95%)	8/856(0%)	Plus/Minus	
Features:					
Query 12		ACGGTATCTGTATGCCACTTTTAA-TATGAATTAATTTAGAGAAAACTATATCTCTC			70
Sbjct 2977396		ACGGTATCTGTATGCCACTTTTAAATATGAATTAATTTAGAGAAAACTATATCTCTC			2977337
Query 71		TATTCGTACCAAGTATTATGGACTAATTATATATAACATTTATATGAGATAACCCACA			130
Sbjct 2977336		TATTCGTACCAAGTATTATGGACTAATTATATATAACATTTATATGAGATAACCCACA			2977277
Query 131		TGAACAAAAGAAAGCCTGGAGTttttttCAGAGCCTGGGGAAGGCATTATGTATCCCA			190
Sbjct 2977276		TGAACAAAAGAAAGCCTGGAGTttttttCAGAGCCTGGGGAAGGCATTATGTATCCCA			2977217
Query 191		TTGCTCTGCTAAGTGTATGTGGCATGATGCTAGGGCTGGGAAGTGGTTTAGCCAGTGATG			250
Sbjct 2977216		TTGCTCTGCTAAGTGTATGTGGCATGATGCTAGGGCTGGGAAGTGGTTTAGCCAGTGATG			2977157
Query 251		ATATGGCAAAGTTAATTCATTCTGGCTATTCCAAATAATTAACCATACCTTGATTTC			310
Sbjct 2977156		ATATGGCAAAGTTAATTCATTCTGGCTATTCCAAATAATTAACCATACCTTGATTTC			2977097
Query 311		TTGTTAGTCTTGCTTTGTTTGCTTTGTTAATTTACCTGTAATGTTTGCATAGCGATTTC			370
Sbjct 2977096		TTGTTAGTCTTGCTTTGTTTGCTTTGTTAATTTACCTGTAATGTTTGCATAGCGATTTC			2977037
Query 371		CCTTAGGATTATTAAGAGATAAGAGGATAAGGCTATGGTGCTTTTCTGGCTTAATTG			430
Sbjct 2977036		CCTTAGGATTATTAAGAGATAAGAGGATAAGGCTATGGTGCTTTTCTGGCTTAATTG			2976977
Query 431		GTTTTATGGCGATGCATCTGGGAACGAACCTTTATCTTAACAGCAGCACTTATTGCTCG			490
Sbjct 2976976		GTTTTATGGCGATGCATCTGGGAACGAACCTTTATCTTAACAGCAGCACTTATTGCTCG			2976917
Query 491		TTGCTGACCAATGTGACACATGGGCAACCATCATTCTGGGGATCCAGTCCCTACAATA			550
Sbjct 2976916		TTGCTGACCAATGTGACACATGGGCAACCATCATTCTGGGGATCCAGTCCCTACAATA			2976857
Query 551		CCAGCGTGTGGGGGAATTGTTGCTGGGTATTAGTCGCCAGCATGTATAAAGATCG			610
Sbjct 2976856		CCAGCGTGTGGGGGAATTGTTGCTGGGTATTAGTCGCCAGCATGTATAAAGATCG			2976797
Query 611		TTAATTTACGATGGCAGATCACTAGGTTTCTATAGCGGCCACGCTCTGGTGCTATCA			670
Sbjct 2976796		TTAATTTACGATGGCAGATCACTAGGTTTCTATAGCGGCCACGCTCTGGTGCTATCA			2976737
Query 671		TTAACTGATTGCGATGA-TGGCATCCGTCGGACCATTCATTATCTGGCCTTCTTTT			729
Sbjct 2976736		TTAACTGATTGCGATGA-TGGCATCCGTCGGACCATTCATTATCTGGCCTTCTTTT			2976678
Query 730		GTT--TCTCTGGGTTGCTCAT-GGCCACTGGTAATCAACTTCTGCTCCTGTAGGTTAGTT			786
Sbjct 2976677		TTCAAATCTCTCAT-GCTCATGGGCCACTGGATATCAACTTCGGTCTGTTGGTTATT			2976619
Query 787		CTACTAGACAGATGCCGTACGTGTGACGATTCCATTCCGCTTAAAC-ATGTCGTGACGAC			845
Sbjct 2976618		CTCTATGCAGTTGCCGAACGTGTGACGATTCCATTCCGCTTAAACATCTGTTGACGTC			2976559
Query 846		ACTGTTACAGTTTCAG 861			
Sbjct 2976558		AGTGTTCGCTTTACG 2976543			

شکل شماره ۳. نتیجه مقایسه قسمتی از توالی ژن به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژن مربوط به ژن PAI

Escherichia coli strain ECOR42 type 1 fimbrial adhesin (fimH) gene, partial cds
Sequence ID: [gb|FJ865748.1](#) Length: 900 Number of Matches: 1

Range 1: 391 to 846 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
833 bits(451)	0.0	456/458(99%)	2/458(0%)	Plus/Plus		
Query 16	ACGCCCTGTGAGCAGTGC	GGGCGGGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAA	TTTGCCTGCT	75		
Sbjct 391	ACGCCCTGTGAGCAGTGC	GGGCGGGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAA	TTTGCCTGCT	449		
Query 76	TATTTTGGCAGACCAAC	CACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTA		135		
Sbjct 450	TATTTTGGCAGACCAAC	CACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTA		509		
Query 136	CGCCAATAATGATGTGG	TGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGAITGCAC		195		
Sbjct 510	CGCCAATAATGATGTGG	TGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGAITGCAC		569		
Query 196	CGTTACTCTGCCGACTAC	CCCTGGTTCAGTGCCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA		255		
Sbjct 570	CGTTACTCTGCCGACTAC	CCCTGGTTCAGTGCCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA		629		
Query 256	AAGCCAAAACCTGGGGT	ATTACCTCTCCGGCACCAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTT		315		
Sbjct 630	AAGCCAAAACCTGGGGT	ATTACCTCTCCGGCACCAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTT		689		
Query 316	CACCAATACCGCGTCGT	TTTTCACCAGCGCAGGGCGTTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGG		375		
Sbjct 690	CACCAATACCGCGTCGT	TTTTCACCAGCGCAGGGCGTTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGG		749		
Query 376	TACGATTATTCAGCGA	ATAACACGGTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTCGGCGGTAAAG		435		
Sbjct 750	TACGATTATTCAGCGA	ATAACACGGTATCGTTAGGAGCAGTAGGGACTTCGGCGGTAAAG		809		
Query 436	TCTGGGATTACGGCAA	ATTACGCACGTACCGGACGGG	473			
Sbjct 810	TCTGGGATTACGGCAA	ATTACGCACGTACCGGACGGG	846			

شکل شماره ۴. نتیجه مقایسه قسمتی از توالی ژن به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژن مربوط به ژن Fim H

بحث و نتیجه گیری

عفونت مجاری ادراری یکی از شایع ترین عفونت های باکتریایی در انسان است که به طور عمده توسط باکتری اشریشیاکلی ایجاد می شود (۱۰). اشریشیاکلی عامل ۸۰-۹۰ درصد عفونت مجاری ادراری اکتسابی از جامعه و ۳۰-۵۰ درصد از عفونت مجاری ادراری بیمارستانی است (۱۵). در مطالعه ای که یولت و همکاران بر روی مبتلایان به عفونت ادراری اشریشیاکلی و ویروالانس پاسخ ایمنی ذاتی در طول عفونت ادراری انجام دادند، مشاهده گردید که کودکان خردسال به صورت مکرر از عفونت دستگاه ادراری رنج می برند و بدون درمان فوری، باکتری می تواند به کلیه صعود کند، جایی که زخم کلیه در آن جا اتفاق خواهد افتاد (۱۶). مطالعه بهروزی و همکاران نیز نشان داد که باکتری اشریشیاکلی پاتوژن غالب جدا شده از نمونه های ادرار است (۱۷).

در مطالعه حاضر، از یک روش مولکولی برای مطالعه حضور ژن های ویروالانس اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک استفاده گردید. آزمون PCR، یک روش مولکولی خیلی اختصاصی، قدرتمند و موثر می باشد که برای آشکارسازی اپران های رمزکننده ادهسین و دیگر

فاکتورهای ویروالانسی که می تواند روی ویروالانس عفونت مجاری ادراری اثر بگذارند، استفاده می شود. نتایج بررسی حاضر موید این نکته می باشد که شیوع عفونت مجاری ادراری در زنان شایع تر از مردان است که این می تواند به خاطر تفاوت در آناتومی مجاری ادراری آن ها باشد که احتمالاً به علت کوتاهی پیشابراه، نزدیکی دهانه خروجی آن با مهبل و مقعد در زنان می باشد که این یافته با مطالعه ای که کنانی و همکاران روی ۱۰۴۹۲ نمونه در شهر کرمانشاه و هم چنین مطالعه ای که منصور و همکاران روی ۷۰۵۶ بیمار با علایم عفونت مجاری ادراری در شهر اهواز انجام دادند مطابقت دارد که در آن مطالعات نیز میزان عفونت در جنس مونث شایع تر بود (۱۸، ۱۹).

فراوانی ژن PAI در نتایج این مطالعه، ۷۶ درصد برآورد شد که نشان دهنده شیوع بالای مارکر PAI در نمونه های ادراری بود. در یک مطالعه انجام شده در آمریکا در سال ۲۰۰۰ که روی بیماران مبتلا به یوروسپسیس انجام شد، شیوع مارکر PAI، ۷۱ درصد گزارش گردید (۲۰). مطالعه نویدینا و همکاران روی نمونه ادرار کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری شیوع مارکر PAI را ۸۹ درصد نشان داد (۲۱). هارز و

شیوع ژن مذکور را ۹۵ درصد گزارش کردند(۲۵). در واقع شیوع بالای ژن Fim H به دلیل چسبندگی آن می باشد(۲۶) که نتایج مطالعات انجام شده توسط پژوهشگران فوق با نتایج تحقیق حاضر سازگاری دارد و بیانگر شیوع بالای این ژن ها در عفونت های ادراری است.

با توجه به احتمال وجود تنوع ژنتیکی در ژن های مورد بررسی، پیشنهاد می گردد این سویه ها از لحاظ تنوع ژنتیکی مقایسه شوند. هم چنین برای دستیابی به اطلاعات جامع و ارزیابی دقیق تر توصیه می شود که در تحقیقات آتی حضور دیگر عوامل ویروالانس مثل توکسین ها، سیستم های جمع کننده آهن نیز همراه با فیمبریۀ مورد بررسی قرار بگیرد تا بتوان مقایسه جامع تری در مورد عوامل ویروالانس سویه های اشریشیاکلی عامل عفونت های ادراری انجام داد.

مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بسیار بالای ژن های Fim H و PAI در سویه های اشریشیاکلی بود که این امر می تواند یک فاکتور خطر در شیوع گسترده موارد عفونت های ادراری در نظر گرفته شود که نیازمند مداخلات بهداشتی و درمانی مناسب به منظور کنترل شیوع عفونت توسط سویه های E.coli ویروالانس می باشد. از جمله محدودیت ها در اجرای این تحقیق، تعداد کم نمونه و عدم انجام ژنوتایپینگ هر ژن به منظور تعیین کلون های ژنتیکی بود.

همکاران بیان کردند که جزایر بیماری زایی(PAI) به میزان زیادی در باکتری اشریشیاکلی وجود دارد و باعث عفونت خارج روده ای می شود. آن ها شیوع هشت مارکر PAI را در سویه های اشریشیاکلی جدا شده از ادرار کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری گزارش کردند(۲۲). از آن جا که بیشتر فاکتورهای ویروالانس خارج روده ای روی عناصر متحرک از جمله PAI به صورت یک دسته ژنی قرار دارند و هم چنین مارکر PAI موجب انتقال افقی ژن های ویروالانس می گردد، شیوع ۷۶ درصدی مارکر PAI می تواند نشان دهنده خطر گسترش وسیع سویه های UPEC با پاتوژنیسته بالا در میان بیماران باشد. هم چنین نتایج به دست آمده در تحقیق ما نشان داد که ۸۴ درصد ایزوله های UPEC دارای ژن Fim H هستند. در مطالعه ای که توسط لان و همکاران در دانشگاه میشیگان انجام شد، مشخص گردید که فیمبریۀ نوع ۱ به مقدار زیادی در طول عفونت دستگاه ادراری بیان می گردد که این بیان می تواند منجر به کاهش حرکت در این باکتری گردد و این موضوع به عنوان یک عامل مهم در عفونت، به ویژه در ۲۴ ساعت از زمان کلونیزاسیون در مثانه، تلقی می گردد(۲۳).

کازمارک و همکاران، شیوع ژن Fim H را ۸۳ درصد برای اشریشیاکلی اظهار داشتند(۲۴). هم چنین در مطالعه ای دیگر، مورنو و همکاران، ۲۱ نمونه اشریشیاکلی از مبتلایان به عفونت ادراری جدا نموده و

References

1. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing Escherichia coli infections. Clin Microbial Rev 1998; 11: 450-79.
2. Elder JS. Urinary tract infection. Nelson text book of pediatrics. 18th ed. Philadelphia Saunders Elsevier Publication. 2007; P. 2223-8.
3. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick. Medical Microbiology. 25th ed. USA Mc Graw Hill Publication. 2010; P.213-9.
4. Tiba MR, Yano T, Leite S. Genotypic characterization of virulence factors in E. coli strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008; 50: 255-60.
5. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. Bad bugs and beleaguered bladders interplay between uropathogenic E. coli and innate host defenses. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8829-35.
6. Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. Integrin mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. PLoS Path 2007; 3: 949-61.
7. Iebba V, Conte MP, Lepanto MS. Microevolution in fimH gene of mucosa associated Escherichia coli strains isolated from pediatric patients with inflammatory Bowel disease. Infect Immun 2012; 80: 1408-17.

8. Schmidt H., Hensel M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Am Soc Microbiol* 2004; 14:56.
9. Lorenzo V, Martinez JL. Aerobactin production as a virulence factor a reevaluation. *Eur J Clin Microbial Infect Dis* 1988; 7:621-9.
10. Griebing TL. Urologic diseases in America project trends in resource use for urinary tract infections in Women. *J Urol* 2005; 173: 1281-7.
11. Antao EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* 2009; 1: 22.
12. Ulleryd P. Febrile urinary tract infection in men. *Int J Antimicrob* 2003; 22: 89-93.
13. Santo E, Macedo C, Marin JM. virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirao Preto Sao Paulo Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48:185-8.
14. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int J Infect Dis* 2013; 17: 450-3.
15. Ejrnaes K. Bacterial characteristic of importance for recurrent urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull* 2011; 58: 1-22.
16. Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. Uropathogenic *E. coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:100-7.
17. Behrooz A, Rahbar M, Yousefi J. A survey on epidemiology of urinary tract infections and resistance pattern of uropathogenes in an Iranian 1000 bed tertiary care hospital. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4: 735-56.
18. Kanani M, Madani S, Khazaei S, Shahi M. The pattern of antibiotic resistance of gram-negative bacilli isolated from the urine medical centre Imam Reza Kermanshah. *J Kermanshah Uni Med Sci* 2010; 21:75-81.
19. Mansour A, Manijeh M, Zohreh P. Study of bacteria isolated from urinary tract infections and determination of their susceptibility to antibiotics. *Jundishapur J Microbiol* 2009; 3: 118-23.
20. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *E.coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; 181: 261-72.
21. Navidinia M, Najari Peerayeh SH, Fallah F, Bakhshi B, Adabian S, Alimehr SH, et al. Distribution of the pathogenicity islands markers in uropathogenic *E.coli* isolated from children in Mofid children Hospital. *Arch Pediatr Infect Dis* 2013; 1: 75-9.
22. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single stranded DNA among natural isolates of *E.coli*. *J Bacteriol* 1990; 172: 6175-81.
23. Lane MC, Simms AN, Mobley HL. Complex interplay between type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *E.coli*. *J Bact* 2007; 189: 5523-33.
24. Kaczmarek A, Budzynska A, Gospodarek E. Prevalence of genes encoding virulence factors among *E. coli* with K1 antigen & non-K1 *E.coli* strains. Nicolaus Copernicus University of Tourn. *J Med Microbiol* 2012; 321- 26.
25. Moreno A, Andreu T, Perez M, Sabate J, Johnson R, Prats G. Relationship between *E.coli* strains causing UTI in women & the dominant faecal flora of the same hosts. University of Minnesota. *Epidemiol Infect* 2006; 134: 1015-23.
26. Lopezbanda DA, Carrillocasas EM, Leyvaleyva M. Identification of Virulence Factors Genes in *E. coli* Isolates from Women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int* 2014; 2:1-10.



Prevalence of Pathogenicity Islands and Fim H Virulence Genes in *Escherichia coli* Strains Isolated from Urinary Tract Infection in Rasht City, Iran

Ghasemipour Z¹, Salehzade A^{1*}, Zamani H²

(Received: December 27, 2016

Accepted: June 24, 2017)

Abstract

Introduction: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is one of the most important etiologic agents of urinary tract infection (UTI). The UPEC strains have various types of virulence factors, including adhesions, toxins, and iron uptake systems. Virulence genes are located on transmissible genetic elements and/or on particular locus on the chromosome called pathogenicity islands (PAI). The aim of the current research was to evaluate the frequency of PAI and Fim H virulence genes among *E. coli* strains isolated from UTIs in Rasht, Iran.

Materials and Methods: This study was conducted on 50 *E. coli* strains, which were isolated from patients with UTIs referring to several medical laboratories of Rasht city. *E. coli* was identified using standard microbiological techniques and biochemical assays. Furthermore, the prevalence of PAI and Fim H virulence genes were evaluated

using the polymerase chain reaction (PCR) technique.

Results: The results showed that 76% of the females and 24% of the males were infected with UTI ($P < 0.01$), which was indicative of the higher rate of UTIs in females than in males. Based on the results of PCR, 42 (84%) and 38 (76%) isolates were positive for Fim H and PAI genes, respectively. Additionally, 33 (66%) isolates carried both of these genes.

Conclusion: As the findings indicated, the prevalence of PAI and Fim H virulence genes in *E. coli* strains accounted for a high rate of UTI. Therefore, these genes could be studied as targets for medical interventions and epidemiological studies.

Keywords: *Escherichia coli*, PAI, Fim H, Urinary tract infection

1. Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Guilan University, Rasht, Iran

* Corresponding author: Email: salehzadehmb@yahoo.com